

VU Research Portal

Molecular analysis of the developmental mechanisms that establish the body plan of petunia

Castel, R.

2009

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Castel, R. (2009). *Molecular analysis of the developmental mechanisms that establish the body plan of petunia*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

5

Nederlandse samenvatting

Rob Castel

Deze samenvatting schrijf ik speciaal voor mensen die niet of nauwelijks bekend zijn met moleculaire biologie. Ik hoop dat zij na het lezen van dit stuk toch een aardig idee hebben gekregen van waar dit proefschrift over gaat. Om deze (uitgebreide) samenvatting begrijpelijk te houden zal ik - bewust - dikwijls wat kort door de bocht gaan en misschien zelfs wel af en toe een halve waarheid opschrijven. Lezers die een uitvoerige beschrijving van alle details en achtergronden verlangen, verwijs ik vriendelijk naar de experimentele hoofdstukken.

In het Nederlands vertaald betekent de titel van dit proefschrift 'moleculaire analyse van de ontwikkeling van het bouwplan van de petunia'. De petunia staat vooral bekend als een sierplant die zomers uitbundig bloeit. Petunia is van Zuid-Amerikaanse herkomst en is familie van onder andere de tomaat, paprika, aubergine, aardappel en de tabaksplant. De naam petunia komt dan ook van een woord dat de oorspronkelijke bewoners van Zuid-Amerika gebruikten voor tabak. Ondanks het beperkte maatschappelijk nut van de petunia, wordt deze plant toch intensief bestudeerd. Dit komt doordat de petunia een geschikt modelorganisme is. Modelorganismen zijn organismen die relatief gemakkelijk te bestuderen zijn en waarvan de vergaarde specifieke kennis, in ieder geval naar verwachting, algemeen toepasbaar is op andere (wel maatschappelijk relevante) organismen. Zo publiceerde Gregor Mendel in de 19^{de} eeuw zijn algemeen geldende erfelijkheidswetten over het overerven van eigenschappen door opeenvolgende generaties, die hij had afgeleid door het bestuderen van erwtenplanten. In dit licht valt het te begrijpen dat de meest intensief bestudeerde modelplant, de fameuze zandraket, een wijdverbreid onkruid is: het is een zeer gebruiksvriendelijk plantje.

Met het bouwplan van een organisme bedoel ik de fundamentele lichaamsbouw, anders gezegd, de basale architectuur van een organisme. Dat van de mens kan worden omschreven als een romp met daaraan vast vier ledematen en een hoofd (en een staart). Het is nog grotendeels een raadsel hoe het bouwplan van organismen wordt bepaald. Met andere woorden: wat bepaalt welke organen waar worden aangelegd? Om daar achter proberen te komen kun je organismen met een verschillend bouwplan met elkaar vergelijken. Een bouwplan als dat van de mens, zoals ik het zojuist schetste, hebben heel veel dieren. Dieren met een ander bouwplan vind je pas in groepen die relatief ver afstaan van de mens, bijvoorbeeld fruitvliegen. De verschillen tussen een fruitvlieg en een mens zijn echter veel te groot om een zinnige vergelijking te kunnen maken. Afgezien van allerlei praktische en ethische bezwaren, zou dit neerkomen op appels met sinaasappels vergelijken. Bij planten ligt dit anders. Zelfs relatief nauw verwante

planten kunnen een ander type lichaamsbouw hebben. Deze verschillen zijn vooral uitgesproken in het deel van de plant dat de bloemen draagt: het reproductieve gedeelte. De ene plant, zoals de zandraket, heeft een steel die omhoog blijft groeien en waar bloemen aan de zijkant aan vast zitten. Bij de andere plant, bijvoorbeeld de petunia, eindigt de steel juist met een bloem in de top en wordt er aan de zijkant een zijscheut gevormd. Deze zijscheut eindigt ook in een bloem nadat er een nieuwe zijscheut is gevormd en op deze manier kunnen oneindig veel bloemen worden gevormd. Op deze wijze ontwikkelt een tomatentros zich ook.

Het reproductieve gedeelte van een plant heet de bloeiwijze, of inflorescentie. In **hoofdstuk twee** bespreek ik hoe verschillende bloeiwijzen zich ontwikkelen en beschrijf ik (voor een deel) de problemen die zich voordoen bij de classificatie van verschillende bloeiwijzen. Helaas is er in de loop der tijd een enorm uitgebreide vocabulaire ontstaan die over het algemeen nogal verwarrend is. Het is met recht een doolhof te noemen, niet in de laatste plaats omdat de classificatie ook daadwerkelijk lastig is. Daarom houd ik een pleidooi voor duidelijkheid. Verder komt de manier waarop de bloeiwijze van de petunia zich ontwikkelt (ook een controversieel onderwerp) aan bod, naast een korte geschiedenis van de petunia en een aantal van de petuniamutanten met een afwijkende bloeiwijze.

Het vergelijken van de ontwikkeling van de verschillende bloeiwijzen van de petunia en de zandraket zouden de factoren kunnen identificeren die ervoor zorgen dat ze een andere lichaamsbouw hebben. Het bouwplan van een bloeiwijze wordt voor zover bekend niet beïnvloed door omgevingsfactoren (bijvoorbeeld de temperatuur of luchtvochtigheid), maar deze ligt vast in het erfelijk materiaal: 'je wordt ermee geboren'. Hiernaar verwijst het 'moleculaire analyse'-gedeelte van de titel van dit proefschrift. Het erfelijk materiaal is het DNA. DNA is een lange code die maar vier verschillende letters bevat. Deze genetische code, die in elke cel zit, is ruim drie miljard letters lang in de mens en ruim één miljard letters in de petunia. Van het grootste gedeelte van de genetische code is de functie onbekend. Het meeste weten we van de stukken DNA die coderen voor eiwitten. Eiwitten zijn de bouwstenen van het lichaam. Deze stukken DNA zijn eiwitcoderende genen. Het menselijke DNA bevat in de orde van grootte van 20.000 eiwitcoderende genen. Ondanks dat de mens wellicht naar de meeste maatstaven het meest complexe organisme op aarde is, is het niet zo dat minder complexe wezens ook minder genen hebben dan de mens. Planten hebben over het algemeen meer genen. De zandraket heeft naar schatting ruim 26.000 genen en rijst zelfs ruim 40.000. Een verandering in een gen, ofwel een mutatie, kan leiden tot een verandering in de opbouw en/of de regulatie van het eiwit waar het voor codeert.

Een belangrijk verschil tussen de ontwikkeling van dieren en planten is dat bij de geboorte van dieren het patroon van de lichaamsbouw al gerealiseerd is, terwijl dit in planten nog moet worden aangelegd. Een dier wordt in principe geboren met alle organen al op de juiste plek aanwezig, maar pas zodra een zaadje kiemt, begint de ontwikkeling van een plant. Hiervoor is een groep stamcellen in de top van de plant, die een meristeem wordt genoemd, essentieel. Stamcellen zijn cellen die kunnen veranderen in alle mogelijke orgaanspecifieke cellen. Op die manier bepalen ze waar en wanneer een blad, bloem of een volgende scheut gevormd gaat worden. De stamcellen van planten en dieren zijn in veel opzichten aan elkaar gelijk.

Om er achter te komen welke mechanismen ervoor zorgen dat een petunia eruitziet zoals ze eruitziet, zijn mutanten noodzakelijk. In mutanten is een bepaald proces verstoord door een verandering in het DNA. In een bepaald soort petunia komen van nature relatief veel mutanten voor die ontstaan door transposon-inserties. Dit transposon heet *dTPH1* en is een klein stukje DNA van slechts 284 letters, dat willekeurig van plek naar plek springt in het DNA. Een transposon kan bij toeval in een gen springen, waardoor dit gen niet meer werkt. Een gemuteerd gen hoeft niet noodzakelijkerwijs merkbare gevolgen te hebben voor de ontwikkeling van de plant, maar aan de andere kant kan één mutatie genoeg zijn om de plantontwikkeling volledig te blokkeren.

Onze strategie was om veel (duizenden) van dit soort petunia's uit te zaaien en op zoek te gaan naar planten met een afwijkende bloeiwijze, oftewel met een afwijkend bouwplan. Dit is een onbevooroordeelde aanpak. We hadden namelijk ook op zoek kunnen gaan naar mutaties in genen waarvan we vermoedden dat deze belangrijk zijn in de ontwikkeling van bloeiwijzen. Op die manier zul je de genen waarvan je nooit gedacht had dat ze belangrijk zouden zijn, maar dat wel zijn, echter nooit vinden.

De mutanten *extrapetals* en *hermit* lijken op het eerste gezicht hetzelfde. De tros bloemen die een petunia normaal gesproken maakt, is in zowel *extrapetals* als *hermit* gereduceerd tot een enkele bloem, als ware het een tulp of papaver. De zijscheut die gewoonlijk zorgt voor het kunnen doorgroeien van de bloeiwijze is dus afwezig. Op het tweede gezicht zijn er wel duidelijke verschillen tussen *extrapetals* en *hermit*, vooral in het uiterlijk van de bloemen die ze maken. De bloemen van *extrapetals*-mutanten hebben extra organen, hier komt de naam *extrapetals* vandaan. Petals is namelijk het Engelse woord voor petalen, de (gekleurde) kroonbladeren. De bloemen van *hermit*-mutanten zien er rommelig uit, we noemen ze daarom ook weleens gekscherend 'ontplofte bloemen'.

Als we eenmaal een mutant hebben gevonden en zo goed mogelijk hebben bekeken wat er van de buitenkant gezien mis gaat, proberen we de mutatie die de afwijking veroorzaakt op te sporen. We gaan er altijd in eerste instantie van uit dat het een *dTPH1*-transposon-insertie betreft, want door deze springende stukjes DNA ontstaan verreweg de meeste mutaties in het soort petunia dat wij gebruiken. Bij het vinden van de juiste transposon-insertie komt nog heel wat kijken, maar uiteindelijk (let wel, dit kan een paar jaar duren) lukt het bijna altijd om het transposon te vinden dat de afwijking veroorzaakt.

In **hoofdstuk drie** laten we zien dat in *extrapetals*-mutanten een gen is uitgeschakeld dat codeert voor een eiwit dat het aan- of uitzetten van genen reguleert. Dit type eiwit heet een transcriptiefactor. Het is gebruikelijk om het gen (en het eiwit waar het voor codeert) met dezelfde naam als de mutant aan te duiden. Het EXTRAPETALS-eiwit fungeert normaal gesproken als een remmer van het maken van bloemen in de stamcellen die de nieuwe zijscheut maken. Het gevolg van de afwezigheid van dit eiwit in *extrapetals*-mutanten is dat bij de vorming van de eerste bloem van de bloeiwijze, de stamcellen van de zijscheut te vroeg een bloem gaan maken. Dit zorgt ervoor dat deze stamcellen worden opgenomen in de eerste bloem, en zo wordt er één grote bloem met extra bloemorganen gevormd.

Dat een dergelijk mechanisme zou bestaan in planten met een bloeiwijze als die van de petunia was al wel voorspeld en er waren ook indirecte aanwijzingen dat het bestond, maar de aard van het mechanisme onthullen wij voor het eerst in **hoofdstuk drie**. De zandraket heeft eenzelfde soort mechanisme, dat verassend genoeg veel gelijkenissen vertoont met dat van petunia, maar de rol ervan is anders. In de zandraket is dit mechanisme niet zozeer belangrijk voor de ontwikkeling van de bloeiwijze, maar alleen belangrijk voor de ontwikkeling van normale bloemen.

Vanuit een evolutionair oogpunt bekeken is dit interessant. Als we even uitgaan van 'de evolutietheorie', dan mogen we aannemen dat de zandraket en de petunia een gemeenschappelijke voorouder hebben. Dat wil zeggen dat er lang geleden, en dan praten we over naar schatting 90 miljoen jaar(!), een plant leefde die de meest recente voorouder is van zowel de zandraket als de petunia. Hoe de bloeiwijze van deze plant eruitgezien heeft weten we niet, maar we nemen aan dat de petunia en de zandraket door mutaties in het DNA en selectie op deze mutaties verschillende soorten zijn geworden. Deze mutaties kunnen geleid hebben tot veranderingen in de sequentie van bepaalde eiwitten en/of de regulatie van waar, wanneer en in welke hoeveelheid deze eiwitten worden gemaakt. We hadden

eigenlijk verwacht dergelijke verschillen te vinden tussen de petunia en de zandraket wat betreft dit mechanisme, maar dit was wat het *EXTRAPETALS*-gen betreft niet zo. Klaarblijkelijk speelt hetzelfde mechanisme een andere rol in twee verschillende bloeiwijzen.

In **hoofdstuk vier** beschrijven we de *hermit*-mutant. In *hermit*-mutanten is ook een transcriptiefactor uitgeschakeld door een transposon-insertie. We laten zien dat dit gen betrokken is bij de aanleg en/of het behoud van stamcellen. Dit dus in tegenstelling tot de functie van het *EXTRAPETALS*-gen, dat de identiteit van stamcellen beïnvloedt, in plaats van hun aanleg of behoud. In *hermit*-mutanten worden de stamcellen voor de zijscheut die de bloeiwijze voortzet nooit aangelegd, of ze gaan al heel vroeg verloren, waardoor de zijscheut niet aanwezig is en er een enkele bloem ontstaat, in plaats van een tros.

Mutatie van het *HERMIT*-gen in de zandraket leidt tot een geheel ander defect dan in de petunia. Deze mutanten gaan snel na de kieming dood, zonder dat nieuwe organen worden aangelegd. Dit komt doordat in deze mutant alle stamcellen in de top verloren gaan. We tonen aan dat het verschil tussen de *hermit*-mutant in de petunia en de zandraket niet te wijten is aan verschillen in de *hermit*-genen, of aan verschillen in de geproduceerde eiwitten. In de petunia gaan niet alle stamcellen verloren doordat in de petunia ook een ander gen dan *hermit* voor het behoud ervan kan zorgen. Dit gen is een soort tweelingbroer van *HERMIT* en kan overal, behalve in de bloeiwijze, zijn plaats innemen. Dit laten we zien door *hermit*-mutanten te kruisen met een mutant van deze tweelingbroer. De 'dubbelmutant', waarin beide genen niet meer werken, ziet er precies zo uit als de zandraket-mutant. We bespreken in de discussie van **hoofdstuk vier** de rol van het soort genen als *HERMIT* in het ontstaan van verschillende bloeiwijzen.

In **hoofdstuk drie en vier** maken we gebruik van een breed scala aan technieken. Bijna niets is meer onmogelijk. Hier wil ik het maken van transgene petunia's (genetisch gemodificeerde petunia's) uitlichten. Dit zijn petunia's waarin we een extra stuk DNA hebben geïntroduceerd. Hieronder geef ik drie voorbeelden van het gebruik van transgene petunia's in ons onderzoek.

We hebben bijvoorbeeld het *HERMIT*-gen van de zandraket in een *hermit*-mutant van de petunia gezet. Dit gen van de zandraket herstelt de *hermit*-mutant; er werden weer trossen bloemen gevormd in plaats van enkele bloemen. Na 90 miljoen jaar van evolutie zijn er dus nog zo veel overeenkomsten tussen deze genen dat het zandraketgen het petuniagen kan vervangen.

De DNA-code die vóór een gen ligt (dit stuk DNA heet de 'promotor') bepaalt vaak in welke cellen van de plant dit gen aan of uit staat. Het is te vergelijken met

een aan-uitknop. Om de aan-uitknoppen van *EXTRAPETALS* en *HERMIT* te bestuderen, hebben we deze stukken DNA, de promotoren dus, vóór een gen gezet dat een blauwe kleurstof kan maken in de plant als het gen aanstaat. Door zulke transgene petunia's en zandraketten te maken, konden we bekijken of de aan-uitknop van het *HERMIT*-gen hetzelfde werkt in een petunia als in een zandraket.

Verder kan het om de functie van een gen te achterhalen nuttig zijn om dit gen overal in de plant aan te zetten. Dit doe je door het gen achter een promotor te zetten die in alle cellen altijd aanstaat. Het gebruik van een dergelijke promotor heeft geregeld spectaculaire gevolgen voor de ontwikkeling van een organisme. Vooral het overal aanzetten van *HERMIT* had een dramatisch effect. Deze voorbeelden prikkelen wellicht een aantal dappere lezers om zich ook te wagen aan de voorgaande hoofdstukken.

Mocht iemand zich afvragen: "Maar als petunia's en zandraketten dezelfde genen hebben, en alle organismen gemeenschappelijke voorouders hebben, heb ik dan ook dezelfde genen als een petunia?" Jazeker! De laatste gemeenschappelijke voorouder van dieren en planten leefde ongeveer 1,6 miljard jaar geleden en die had genen die in al het nageslacht zijn behouden, dus ook in de mens.

Tot slot, het soort onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven, levert informatie op die kan worden toegepast om bijvoorbeeld de kwaliteit en hoeveelheid van de oogst van een bepaald product te verbeteren. Denk bijvoorbeeld aan extra smakelijke kiwi's, supergezonde paprika's, of dubbel zo veel tomaten per tros. Zo zie je dat dit onderzoek niet alleen leidt tot antwoorden op fundamentele vragen over het leven, maar ook van nut kan zijn voor de mensheid.